

**PRODUKSI ASAM HIALURONAT OLEH *Streptococcus zooepidemicus*
DENGAN KULTIVASI CURAH (BATCH) DAN SEMI-SINAMBUNG (FED-BATCH)
PADA FERMENTOR SKALA MENENGAH (10 L)**

Erliza Noor

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a major macromolecule component of the intercellular matrix of most connective tissues such as joint fluid, vitreous, cord etc. This acid can also be obtained from microorganisms, e.g. the Streptococcus bacteria. As a continuation of a prior research conducted on small scale, the objective of the research was to produce hyaluronic acid from Streptococcus zooepidemicus on a medium scale fermentor (10 L) and to observe the possibility to reduce the utilization of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ if compared to formerly conducted research (28 g/L). From the three concentrations observed, the natrium phosphate salt consumption of 14 g/L was more favorable financially. Production of hyaluronic acid on a medium scale involved batch and fed-batch wise cultivation at an optimum process condition. Results revealed that fed-batch cultivation increased the yield of hyaluronic acid up to 72 % if compared to batch cultivation with better hyaluronic acid pureness, i.e. 55 %. A significant impact induced by both cultivations were its cultivation time wherein that duration of fed-batch was longer than batch cultivation, consequently producing higher cell and biomass concentrations.

Key words: *hyaluronic acid, batch/ fed-batch cultivation*

PENDAHULUAN

Biopolisakarida telah menjadi satu senyawa yang sangat penting untuk industri kimia, pangan, farmasi, kedokteran dan kosmetika. Produksi biopolisakarida, untuk keperluan bidang kedokteran, khususnya yang menggunakan proses kultivasi mikroba masih sangat jarang dilakukan. Biopolisakarida yang telah diproduksi secara komersial umumnya digunakan di bidang pangan (xanthan, alginat, curdlan, gellan, pullulan), industri minyak (xanthan, zanflo-10, scleroglukan), dan industri lainnya (rhamsan, welan). Salah satu biopolisakarida potensial untuk bidang kedokteran dan kosmetika adalah asam hialuronat.

Asam hialuronat adalah salah satu dari senyawa dasar pada tubuh manusia yang mempunyai fungsi untuk mengikat air dan menahan sel agar selalu berada dalam matriks yang menyerupai jel. Fungsi lainnya adalah sebagai pelumas pada persendian-persendian tubuh. Perubahan konsentrasi dan derajat polimerisasi dari asam hialuronat pada cairan pengikat akan menimbulkan terhambatnya perkembangan persendian. Asam hialuronat telah digunakan secara luas seperti pada penyembuhan arthritis, katup jantung buatan, operasi mata, penyembuhan luka bakar serta bahan baku lotion permajaan kulit.

Sampai saat ini rincian tahapan dari metode produksi asam hialuronat belum diketahui secara pasti. Hal ini dikarenakan metode produksi secara komersial umumnya masih dilindungi oleh hak

paten (Shiseido, 1985, 1984; Chisso, 1984,1985). Demikian pula publikasi mengenai kondisi operasi produksi asam hialuronat masih jarang ditemukan. Umumnya produksi asam hialuronat masih dilakukan dengan metode curah (Johns *et al.*, 1994). Optimasi produksi antara lain ditentukan oleh metode kultivasi, baik secara curah (*batch*) semi-sinambung (*fed-batch*) dan sinambung (*continue*).

Untuk meningkatkan produktifitas asam hialuronat dilakukan penggandaan skala (produksi dalam skala yang lebih besar). Penggandaan skala merupakan suatu proses peralihan dari suatu kegiatan produksi skala laboratorium ke skala *pilot plant* maupun ke skala industri. Proses peralihan tersebut tidak berlangsung sederhana melainkan kompleks karena harus memperhatikan berbagai parameter yaitu parameter fisik (suhu, agitasi, tekanan, dan lain-lain) dan parameter kimia (konsentrasi substrat, produk).

Kultivasi curah dan semi-sinambung telah diterapkan secara luas dalam berbagai industri fermentasi. Kultivasi semi sinambung dapat menjaga konsentrasi substrat sisa pada tingkat yang rendah (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Selain itu juga dapat menghindari efek represif yang ditimbulkan oleh penggunaan sumber karbon secara cepat dan menjaga kondisi kultur selama aerasi pada fermentor (Stanburry dan Whitaker, 1984). Apabila dibandingkan dengan proses sinambung, maka proses semi-sinambung relatif lebih mudah untuk diterapkan sebagai perbaikan dari proses curah terutama dalam hal lama kultivasi. Lama kultivasi untuk

memproduksi asam hialuronat berhubungan dengan siklus pertumbuhan mikroba *Streptococcus zooepidemicus*. Produktivitas asam hialuronat yang tinggi diharapkan dapat terwujud pada waktu kultivasi yang lebih lama dan dengan laju pertumbuhan sel yang lebih baik. Salah satu mineral yang digunakan didalam kultivasi adalah Na-fosfat, menurut Wirahadikusumah (1989) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ memiliki fungsi untuk menjaga keseimbangan metabolisme dan berperan dalam biotransformasi energi. Namun dengan alasan ekonomi, penggunaan bahan ini dijaga untuk tidak berlebihan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh pengurangan penggunaan garam natrium fosfat dan optimasi produksi asam hialuronat oleh *Streptococcus zooepidemicus* melalui kultivasi curah (*batch*) dan semi-sinambung (*fed-batch*) pada skala menengah (10 L).

BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), agar, glukosa, adenin, guanin, urasil, L-asparagin, L-glutamin, L-sistin, NaOH, indikator *fenol red*, etanol teknis 95 %, ekstrak khamir, H_2SO_4 , m-phenyl fenol, borax, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, dan $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kultur biakan mikroba yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *Streptococcus zooepidemicus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 93-12-39920 STCO *equi* SB-SP *zooepidemicus*, USA.

Peralatan yang dipakai dalam penelitian meliputi labu erlenmeyer (5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml), bioreaktor *Biostat-V* 13.7 L (volume kerja 10 L), *shaker*, spektrofotometer *GBC UV/VIS 911A*, *Shidmadzu Atomic Absorption/Flame Spectrophotometer* Model AA-646, timbangan analitik, otoklaf, oven, ruang steril (*clean blench*), *laminar flow cabinet*, viskosimeter *Brookfield LVF 4 speed- 4 spindles*, pH meter Hanna-519, *hot plate magnetic stirrer*, vortek *Thermoline* type 37600 *mixer*, *freezer Sony*, kulkas *Sony*, *Sorvall RC 5 Ultracentrifugator*, mikroskop, jarum Ose, tabung reaksi, kaca objek, labu ukur, labu takar, aluminium foil, kapas, pipet dan tabung *ependorf*.

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengamati pengaruh pengurangan penggunaan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ terhadap produksi asam hialuronat. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu persiapan inokulum, kultivasi, dan destruksi cairan bebas sel.

Persiapan Inokulum

Kultur *Streptococcus zooepidemicus* dibiakan secara bertahap pada media propagasi 5 ml, 50 ml

dan kemudian 500 ml. Komposisi media propagasi terdiri atas BHI sebanyak 0.185 g dan glukosa sebanyak 0.04 g. Inokulum pada media propagasi 50 ml yang densitas optiknya telah mencapai 0.6-1.0 kemudian diinokulasikan pada 500 ml media kultivasi dan diinkubasi dalam *shaker*. Media kultivasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi media kultivasi penelitian pendahuluan (Fahma, 1997)

Komponen	Media (per liter)
Glukosa	15 g
Ekstrak Khamir	10 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	28 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Adenin	1 mg
Guanin	1 mg
Urasil	1 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
L-Asparagin	0.03 g
L-Glutamin	0.05 g
L-Sistin	0.1 g

Pada tahap ini digunakan tiga variasi penggunaan garam $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yakni sebanyak 7 g/L, 14 g/L dan 28 g/L. Media kultivasi tersebut disterilisasi terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit. Kultivasi dilakukan pada suhu 37°C, yang merupakan suhu optimum produksi asam hialuronat, pH 7.1 dan kecepatan agitasi 100 rpm. Selama kultivasi berlangsung dilakukan pengontrolan pH dengan penambahan larutan NaOH 2.5 M. Pengambilan sampel pertama kali dilakukan pada saat jam ke-0 sesaat setelah inokulasi dan selanjutnya dilakukan setiap satu jam sekali selama 24 jam.

Destruksi Cairan Bebas Sel

Kaldu kultivasi harus disentrifugasi terlebih dahulu untuk mendapatkan cairan bebas sel pada ultrasentrifugator dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit kemudian dilakukan pemisahan antara cairan bebas sel dan biomasanya. Cairan bebas sel tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan H_2SO_4 pekat sebanyak 2.5 ml. Campuran tersebut dibakar pada alat destruksi selama 2 jam atau sampai mendapatkan cairan bening dan keadaan dalam labu Kjeldhal tidak berasap. Cairan bening tersebut diencerkan kemudian dilakukan pengujian kadar Natrium oleh *Atomic Absorption Spectrophotometer* (ASS). Alat tersebut dapat mengukur kadar natrium pada selang konsentrasi 0.0 – 2.0 ppm, sehingga apabila lebih dari nilai tersebut alat akan menunjukkan *over* dan cairan bening tersebut perlu diencerkan kembali.

Pada penelitian utama dilakukan beberapa tahapan yaitu :

Persiapan Inokulum

Kultur *Streptococcus zooepidemicus* disegar-kan dahulu pada media *plate agar*. Komposisi media *plate agar* adalah BHI sebanyak 37 g/L, glukosa 8 g/L dan agar sebanyak 2 %. Kemudian biakan tersebut diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hasil inkubasi tersebut selanjutnya diambil satu ose biakan *Streptococcus zooepidemicus* dan dipindahkan ke media propagasi 10 ml serta diinkubasikan selama 12-14 jam atau sampai keruh pada inkubator bersuhu 37°C. Komposisi media propagasi 10 ml terdiri atas BHI 0.37 g dan glukosa 0.08 g. Kemudian 10 ml media propagasi tersebut dipindahkan ke media propagasi 100 ml dan diinkubasikan selama 12-14 jam pada inkubator bersuhu 37°C atau sampai OD_{530nm} mencapai 0.8 – 1.0. Komposisi media propagasi 100 ml adalah BHI 3.7 g dan glukosa 0.8 g. Hasil inkubasi tersebut ditransfer ke media propagasi 1 L dengan komposisi terdiri atas BHI sebanyak 37 g dan glukosa sebanyak 8 g dan diinkubasikan pada inkubator bersuhu 37°C. Kultur tersebut siap ditransfer ke fermentor dengan volume kerja 10 L apabila OD_{530nm} telah mencapai nilai 1.5 – 2.0.

Kultivasi pada Bioreaktor Volume Kerja 10 L

Inokulum pada media propagasi 1 L yang densitas optiknya telah mencapai 1.5 - 2.0 kemudian diinokulasikan pada 10 L media kultivasi yang ada dalam fermentor. Media kultivasi tersebut disterilisasi terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit. Komposisi garam Na₂HPO₄·2H₂O yang digunakan di dalam media kultivasi adalah konsentrasi terbaik hasil penelitian pendahuluan yaitu 14 g/L. Sedangkan komposisi lainnya sesuai dengan komposisi media pada penelitian pendahuluan (Tabel 1).

Kultivasi dilakukan pada suhu 37°C, pH 7.1 dan kecepatan agitasi 68 rpm. Pada kultivasi curah substrat (glukosa) dipasok dalam media kultivasi sejak awal, sementara pada kultivasi semi-sinambung substrat dipasok sebanyak tiga kali. Selama fermentasi dilakukan pengontrolan pH secara otomatis dengan penambahan larutan NaOH 8M. Pengambilan sampel pertama kali dilakukan pada saat jam ke-0 sesaat setelah inokulasi selanjutnya dilakukan setiap sejam sekali. Pengambilan sampel dilakukan setiap satu jam untuk mengukur viskositas. Pada kultivasi semi-sinambung, apabila OD_{530nm} menunjukkan penurunan maka ditambahkan 30 g ekstrak khamir dan 50 g glukosa dalam 150 ml air demineralisasi untuk mempertahankan pertumbuhan. Dua jam setelah penambahan tadi dilakukan penambahan 50 g glukosa dalam 100 ml air demineralisasi ke dalam fermentor. Hal ini untuk menjaga pertumbuh-

an sel karena ketersediaan glukosa sebagai substrat pembatas dapat dijaga pada konsentrasi rendah. Apabila viskositas masih meningkat, maka dilakukan lagi penambahan 50 g glukosa dalam 100 ml air demineralisasi. Pada saat viskositas mencapai ke-stabilan maka kultur mulai mengalamai fase kematian.

Analisis Contoh

Analisis contoh yang dilakukan adalah pengukuran densitas optik (Noor, 1989), pengukuran kandungan asam hialuronat (Sutherland, 1990), uji kemurnian kandungan asam hialuronat, viskositas kaldu, konsentrasi biomassa kering (Bjorn dan Ricica, 1967), pengujian kadar glukosa dengan metode DNS, metode pewarnaan kapsul untuk uji kontaminasi (Hadioetomo, 1989) dan rheologi (viskositas cairan kultivasi).

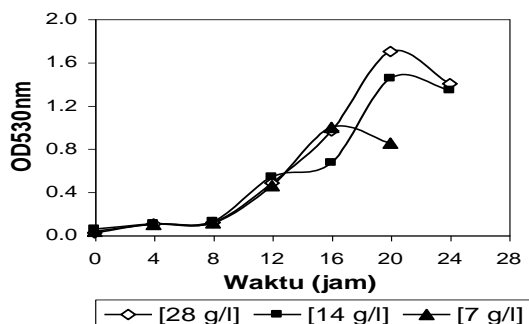
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Pendahuluan

Pengamatan dilakukan terhadap konsentrasi garam natrium fosfat yang digunakan sebesar 7 g/L, 14 g/L dan 28 g/L pada kultivasi curah pada kondisi operasi yang sama dan viskositas kaldu akhir sekitar 8.5 cP. Tingkat konsumsi garam natrium fosfat yang diamati menunjukkan antara dua konsentrasi awal tidak jauh berbeda yaitu masing-masing sebesar 9.30 dan 9.96 ppm. Usaha untuk mengurangi penggunaan garam natrium fosfat dengan konsentrasi 7 g/L menunjukkan hasil yang kurang efisien apabila dibandingkan dua konsentrasi sebelumnya. Pada konsentrasi ini viskositas kaldu akhir adalah 6.4 cP dengan tingkat konsumsi garam natrium fosfat sebesar 1.89 ppm. Penggunaan garam natrium fosfat yang sangat kecil ini berdampak terhadap pertumbuhan sel *Streptococcus zooepidemicus*. Garam natrium fosfat memiliki fungsi untuk menjaga keseimbangan metabolisme dan berperan dalam biotransformasi energi, sehingga pertumbuhan sel terganggu. Kurva pertumbuhan sel *Streptococcus zooepidemicus* untuk ketiga konsentrasi garam natrium fosfat diberikan pada Gambar 1.

Gambar 1 memperlihatkan bahwa ketiga konsentrasi garam natrium fosfat selama 12 jam pertama memiliki pertumbuhan sel yang hampir sama. Berdasarkan kerapatan optik ketiga konsentrasi garam natrium fosfat terlihat bahwa kerapatan optik terbesar pada konsentrasi 28 g/l diperoleh pada jam ke-20 sebesar 1.689. pada waktu yang sama kerapatan optik pada konsentrasi 14 g/l adalah 1.451. Dilain pihak pada konsentrasi 7 g/l, kerapatan optik tertinggi diperoleh pada jam ke-16 sebesar 0.997. Nilai kerapatan optik yang lebih kecil dibandingkan dua konsentrasi sebelumnya menunjukkan pertumbuhan

sel pada penggunaan garam $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 7 g/l relatif lebih sedikit.



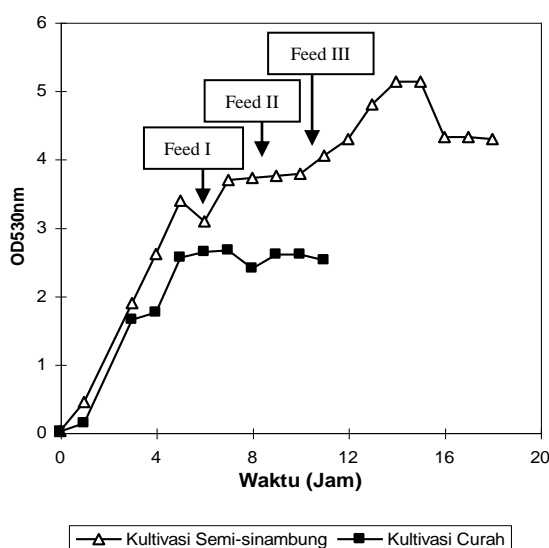
Gambar 1. Pertumbuhan sel *streptococcus zooepidemicus* dengan berbagai konsentrasi garam natrium fosfat

Penggunaan garam natrium fosfat dengan konsentrasi 14 g/L ternyata menunjukkan pertumbuhan sel, viskositas kaldu akhir serta tingkat konsumsi garam natrium fosfat yang lebih efisien apabila dibandingkan dua konsentrasi lainnya. Hasil penelitian pendahuluan ini digunakan untuk optimasi konsentrasi garam natrium fosfat pada skala yang lebih besar (10 L).

Penelitian Utama

Pertumbuhan Sel

Kurva pertumbuhan sel *Streptococcus* pada media kultivasi 10 L secara curah dan semi-sinambung diberikan pada Gambar 2.

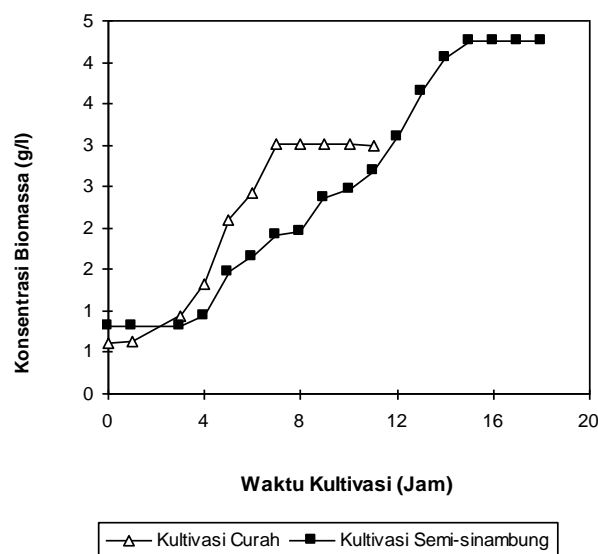


Gambar 2. Pertumbuhan *Streptococcus zooepidemicus* dengan kultivasi curah dan semi-sinambung

Pada skala 10 L, penambahan substrat (glukosa) pada awal jam ke-7 mengakibatkan adanya peningkatan konsentrasi sel dibandingkan kultivasi curah sebesar 39 % pada akhir jam ke-7. Penambahan glukosa juga dapat meningkatkan lama kultivasi karena ketersediaan glukosa sebagai substrat pembatas dapat dijaga pada konsentrasi rendah sehingga sel *Streptococcus zooepidemicus* dapat terus mengalami pertumbuhan. Kerapatan optik tertinggi pada kultivasi semi-sinambung meningkat 93 persen dibandingkan kerapatan optik tertinggi pada kultivasi curah. Pada jam ke-16 kerapatan optik mengalami penurunan karena sel *Streptococcus zooepidemicus* mengalami lisis dan kematian akibat semakin habisnya substrat yang tersedia.

Pembentukan Biomassa

Pembentukan biomassa untuk kultivasi curah dan semi-sinambung diberikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pembentukan biomassa dengan kultivasi curah dan kultivasi semi-sinambung

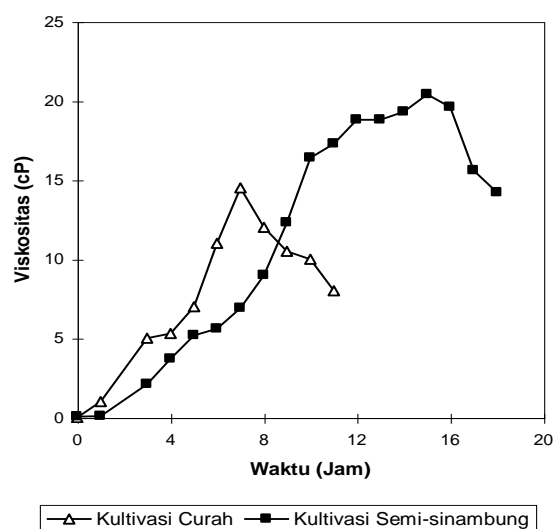
Konsentrasi biomassa tertinggi kultivasi semi-sinambung diperoleh pada saat kerapatan optik mencapai nilai maksimal yaitu pada jam ke-15 sebesar 4.25 g/L atau meningkat sekitar 41 % dibandingkan kultivasi curah yang memperoleh konsentrasi biomassa tertinggi pada jam ke-7.

Pada setiap penambahan glukosa (*feeding*) pada kultivasi semi-sinambung mengakibatkan konsentrasi biomassa rata-rata sebesar 0.3 g/L. Hal ini sesuai pernyataan Stanbury dan Whitaker (1984) bahwa konsentrasi substrat yang cukup mengakibatkan sel dapat melanjutkan reproduksi seluler sehingga konsentrasi biomassa terus meningkat.

Laju pertumbuhan sel spesifik maksimal (μ_{maks}) kultivasi curah diperoleh pada interval jam ke-6 sampai jam ke-8 yaitu sebesar 0.301 jam^{-1} , sedangkan pada kultivasi semi-sinambung, setelah penambahan glukosa μ_{maks} diperoleh pada jam ke-9 sebesar 0.189 jam^{-1} . Perbedaan μ_{maks} terjadi karena pada kultivasi semi-sinambung setelah penambahan glukosa sel *Streptococcus zooepidemicus* tetap mengalami pertumbuhan namun dengan laju pertumbuhan yang relatif lambat. Hal ini sesuai dengan kerapatan optik yang meningkat secara perlahan setelah *feeding* (jam ke-6 sampai jam ke-11) dibandingkan waktu-waktu sebelumnya.

Rheologi

Perubahan viskositas dengan kultivasi curah dan semi-sinambung dapat dilihat pada Gambar 4.



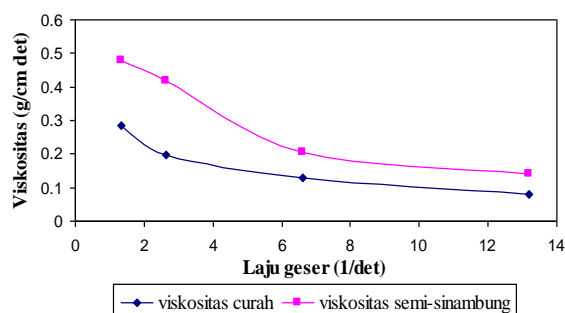
Gambar 4. Pola perubahan viskositas pada kultivasi curah dan kultivasi semi-sinambung.

Hasil pengamatan terhadap perubahan viskositas pada kultivasi curah menunjukkan bahwa viskositas akan meningkat pesat selama fase eksponensial sampai fase stasioner. Pada proses pertumbuhan sel *Streptococcus zooepidemicus* dihasilkan kapsul berlendir (Sutherland, 1990). Semakin tinggi konsentrasi sel maka semakin banyak kapsul berlendir yang terbentuk, sehingga cairan kultivasi menjadi semakin kental. Viskositas tertinggi pada kultivasi curah terjadi pada jam ke-7 yaitu sebesar 14.5 cP sedangkan pada kultivasi semi-sinambung terjadi pada jam ke-15 sebesar 20.4 atau meningkat sekitar 41 %. Pada Gambar 4 terlihat bahwa viskositas tertinggi pada kultivasi curah dapat dicapai hanya setengah dari fase eksponensial pada kultivasi semi-sinambung. Perbedaan viskositas yang tinggi menunjukkan bahwa semakin lama kultivasi, maka vis-

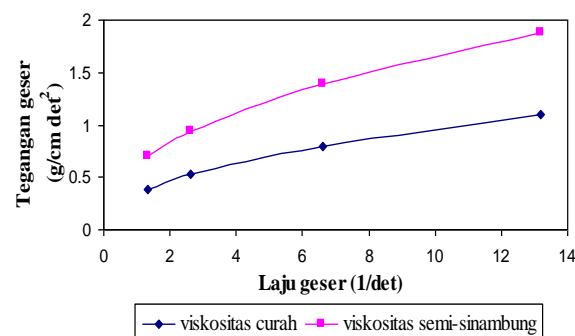
kositas memiliki kecenderungan meningkat sejalan peningkatan konsentrasi produk asam hialuronat.

Penurunan viskositas pada kultivasi curah dan semi-sinambung masing-masing dimulai pada jam ke-7 dan jam ke-15. Hal ini diduga disebabkan oleh aktifitas enzim hialuronidase yang berlebihan sehingga dengan adanya agitasi menyebabkan terputusnya rantai-rantai polimer asam hialuronat atau terjadi degradasi asam hialuronat.

Hal lain yang perlu diperhatikan adalah pengaruh laju geser atau *shear rate* dan tegangan geser atau *shear stress*. Hasil pengamatan terhadap rheologi pada kultivasi curah dan semi-sinambung diberikan pada Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 5. Grafik hubungan antara laju geser dan viskositas kultivasi curah dan semi-sinambung.



Gambar 6. Grafik hubungan antara tegangan geser dan laju geser pada kultivasi curah.

Berdasarkan Gambar 5 dan Gambar 6 sifat rheologi kultivasi curah dan semi-sinambung menunjukkan sifat pseudoplastik. Hal tersebut tidak hanya sesuai dengan pola aliran yang digambarkan oleh Mackay (1988) melainkan juga oleh ciri khas rheologi cairan kultivasi asam hialuronat yaitu viskositas asam hialuronat akan menurun pada kecepatan agitasi atau laju geser yang lebih tinggi. Lebih lanjut Sutherland (1990) menyatakan bahwa pengadukan dengan kecepatan agitasi tinggi pada polimer polisakarida akan menyebabkan pemutusan ikatan rantai-rantai polimer polisakarida.

Tegangan geser untuk kandungan asam hialuronat sebanyak 3.53 g/L pada kultivasi curah berkisar antara 0.38 sampai 1.10 g cm⁻¹ det⁻² dengan nilai K = 0.34 g cm⁻¹ detⁿ⁺² dan nilai n = 0.46. Pada kultivasi semi-sinambung dengan kandungan asam hialuronat sebesar 6.07 g/L maka tegangan geser berkisar antara 0.40 sampai 1.80 g cm⁻¹ det⁻² dan nilai K = 0.62 g cm⁻¹ detⁿ⁺² serta nilai n = 0.43. Tegangan geser kultivasi semi-sinambung rata-rata meningkat sebesar 63 persen dibandingkan kultivasi curah.

Berdasarkan pengamatan data-data yang tersedia maka dihasilkan model untuk menentukan viskositas (μ) masing-masing kultivasi yaitu :

1. Kandungan asam hialuronat 3.53 g/L

$$\mu = 0.34\gamma^{-0.54}$$

2. Kandungan asam hialuronat 6.07 g/L

$$\mu = 0.62\gamma^{-0.57}$$

Sedangkan untuk tegangan geser (τ), model masing-masing kultivasi sebagai berikut :

1. Kandungan asam hialuronat 3.53 g/L

$$\tau = 0.34\gamma^{0.46}$$

2. Kandungan asam hialuronat 6.07 g/L

$$\tau = 0.62\gamma^{0.43}$$

Sifat bukan-Newton (*non-Newtonian*) seperti kepekaan terhadap laju geser pada kultivasi semi-sinambung relatif lebih besar dibandingkan kultivasi curah. Hal ini disebabkan nilai n (indeks perilaku) kultivasi semi-sinambung lebih mendekati nol dibandingkan kultivasi curah. Menurut Mackay (1988), nilai n dapat digunakan untuk mengetahui kekuatan sifat Newton atau bukan-Newton suatu cairan kultivasi.

$$NRe = \frac{Di^2 N^{2-n} \rho}{0.1 K} \times \left[\frac{n}{6n + 2} \right] \dots\dots (1)$$

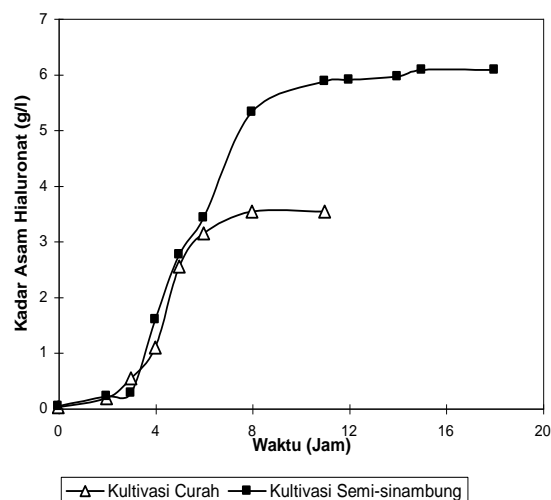
dimana :

- NRe = bilangan Reynolds
N = kecepatan putaran agitasi
P = densitas cairan
Di = garis tengah agitator

Hasil perhitungan bilangan Reynolds (persamaan 1) menunjukkan bahwa tipe aliran cairan kultivasi curah (NRe = 977.3) dan semi-sinambung (NRe = 1518.3) bersifat transisi karena $10 < NRe < 10\,000$ dan $K > 0$. Tenaga yang dibutuhkan agitator pada kultivasi curah dan semi-sinambung masing-masing sebesar 0.08 dan 0.10 HP/m³.

Pembentukan Asam Hialuronat

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap pola pembentukan asam hialuronat yang diberikan pada Gambar 7 terlihat bahwa kandungan asam hialuronat kultivasi semi-sinambung lebih besar dibandingkan kultivasi curah.



Gambar 7. Pola pembentukan asam hialuronat kultivasi curah dan kultivasi semi-sinambung.

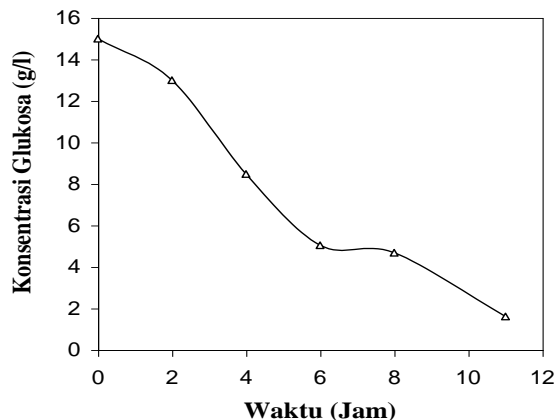
Pada kultivasi semi-sinambung kandungan asam hialuronat tertinggi diperoleh pada jam ke-15 yaitu sebanyak 11.04 g/L dengan tingkat kemurnian 55 persen atau kandungan asam hialuronat murni sebesar 6.07 g/L. Pada kultivasi curah pembentukan produk tertinggi terjadi pada jam ke-7 dengan kandungan asam hialuronat sebesar 7.21 g/L dan tingkat kemurnian adalah 49 persen atau kandungan asam hialuronat murni sebanyak 3.53 g/L. Berdasarkan data tersebut berarti terjadi peningkatan sekitar 72 % asam hialuronat pada kultivasi semi-sinambung dibandingkan kultivasi curah.

Pembentukan asam hialuronat tertinggi baik pada kultivasi curah maupun semi-sinambung terjadi pada saat konsentrasi sel, biomassa dan viskositas cairan kultivasi berada pada titik tertinggi. Hal ini sesuai penelitian Van de Rijn (1983) yang menyatakan bahwa semakin tinggi viskositas larutan maka asam hialuronat yang diproduksi akan semakin banyak. Lebih lanjut Laurent (1970) menjelaskan bahwa produk-produk polimer polisakarida seperti asam hialuronat terbentuk pada kapsul atau berupa lendir yang dikeluarkan sel mikroba sehingga dengan semakin tingginya pertumbuhan sel akan menyebabkan cairan kultivasi menjadi kental.

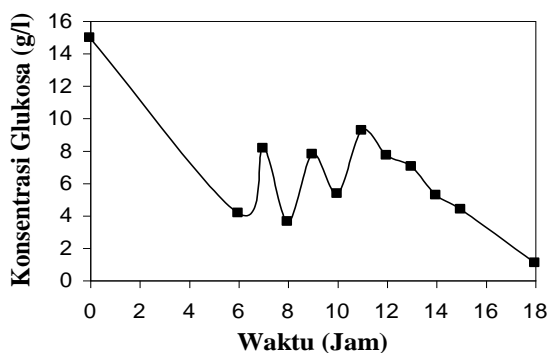
Efektifitas penambahan glukosa sebanyak tiga kali terhadap pembentukan asam hialuronat ditunjukkan dengan adanya peningkatan rata-rata asam hialuronat selama selang waktu setelah *feeding* yaitu sebesar 0.23 g/L dalam setiap jam.

Penggunaan Glukosa

Penggunaan glukosa sebagai substrat selama kultivasi curah dan semi-sinambung diberikan pada Gambar 8 dan Gambar 9.



Gambar 8. Pola penggunaan glukosa pada kultivasi curah



Gambar 9. Pola penggunaan glukosa pada kultivasi semi-sinambung

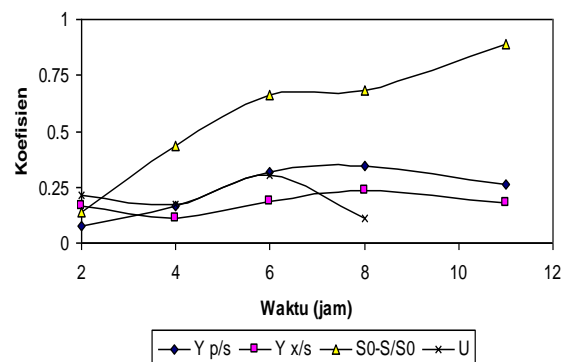
Pada kultivasi curah nampak bahwa konsentrasi glukosa mengalami penurunan sampai akhir kultivasi. Penurunan disebabkan selama kultivasi substrat digunakan untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produk. Konsentrasi glukosa pada akhir kultivasi curah tersisa 1.61 g/L atau telah dikonsumsi sebesar 90 persen. Penurunan konsentrasi sel pada jam ke-7 terjadi pada saat konsentrasi glukosa sekitar 4.68 – 5.05 g/L. Selang ini diduga sebagai batas ketersediaan glukosa agar sel *Streptococcus zooepidemicus* mengadakan pembentukan asam hialuronat.

Nilai $Y_{p/s}$ pada kultivasi curah, yang merupakan nilai koefisien konversi substrat menjadi produk, mencapai nilai tertinggi pada jam ke-8 sebesar 0.34 g produk/ g substrat. Sedangkan nilai $Y_{x/s}$, yang merupakan nilai efisiensi konversi substrat menjadi biomassa, mencapai nilai tertinggi pada interval jam ke-8 sampai jam ke-11 yaitu sebesar 0.23 g biomassa/g substrat. Berdasarkan data μ_{maks} dan $Y_{p/s}$ pada kultivasi curah dapat diprediksi jumlah dan waktu glukosa yang ditambahkan (*feeding*).

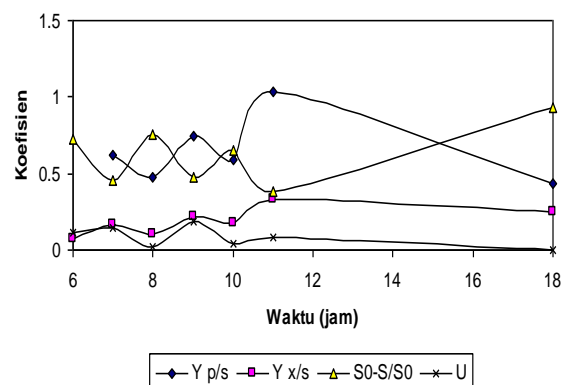
Penambahan glukosa pada awal jam ke-7 dilakukan karena dengan kultivasi curah pada waktu tersebut konsentrasi biomassa maksimal (X_{maks}) dan kadar glukosa yaitu sebesar 4.13 g/L. Disamping

itu, laju alir pemasukan glukosa setiap dua jam setelah penambahan glukosa sebelumnya dilakukan berdasarkan perhitungan data μ_{maks} pada kultivasi curah (0.301/jam).

Penambahan glukosa sebesar 5 g/L selain berdasarkan untuk menjaga ketersediaan glukosa di atas selang kritis, juga ditentukan dengan nilai koefisien $Y_{p/s}$ pada kultivasi curah. Nilai $Y_{p/s}$ tertinggi pada jam ke-8 sebesar 0.341 diperoleh dengan penggunaan glukosa sekitar 10 g/L. Pada jam ke-14 dan jam ke-15 pertumbuhan biomassa maksimal (4.25 g/L). Setelah penambahan glukosa nilai μ_{maks} dicapai pada jam ke-9 yaitu sebesar 0.19/jam. Efisiensi pemakaian substrat (glukosa) menjadi biomassa ($Y_{x/s}$) tertinggi diperoleh pada jam ke-11 sebesar 0.33. Nilai ini meningkat sekitar 41 persen dibandingkan kultivasi curah. Hal ini disebabkan konsentrasi inokulum pada awal kultivasi lebih besar sehingga mengakibatkan efisiensi pemakaian glukosa menjadi biomassa meningkat pula. Nilai $Y_{p/s}$ tertinggi diperoleh sebesar 1.03 g produk/g substrat. Nilai-nilai parameter kinetika kultivasi curah dan semi-sinambung diberikan pada Gambar 10 dan Gambar 11.



Gambar 10. Pola nilai-nilai $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, S_0-S/S dan μ pada kultivasi curah



Gambar 11. Pola nilai-nilai $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, S_0-S/S dan μ pada kultivasi semi-sinambung

Menurut Stanbury dan Whitaker (1984) dengan menggunakan rumus $F = D \times V$ akan dapat diperoleh laju alir media yaitu sebesar 3.01 l/jam. Pada laju alir tersebut penambahan glukosa akan habis selama kurang lebih 3 jam. Jadi waktu dua jam dipilih agar glukosa yang tersedia dalam fermentor masih berada dalam selang kritis ketersediaan glukosa. Penambahan tersebut juga dilakukan sesuai penelitian Smith (1981) yang menyatakan bahwa waktu yang dibutuhkan bakteri untuk mengandakan diri berkisar antara 20–120 menit.

KESIMPULAN

Penggunaan garam natrium fosfat dengan konsentrasi 14 g/L lebih efisien jika dibandingkan dengan konsentrasi 7 g/L dan 28 g/L. Hal ini berdasarkan tingkat konsumsi garam natrium fosfat dan harga viskositas kaldu.

Kultivasi semi-sinambung (*fed-batch*) dapat meningkatkan kandungan asam hialuronat sekitar 72 persen lebih banyak dibandingkan kultivasi curah. Penambahan substrat ke dalam cairan kultivasi berupa glukosa dan ekstrak khamir selama proses kultivasi berlangsung mampu memperpanjang umur hidup sel *Streptococcus zooepidemicus* sehingga mampu menghasilkan asam hialuronat lebih banyak dengan tingkat kemurnian lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bjorn, H and J. Ricica. 1967. Production of Hyaluronic Acid by Streptococcal Strain in Batch Culture. *Applied Microbiology*. Vol 15 No.6, 1409-1413.
- Chisso, Abstract of Japan Patent 186090 5 Sept 84, J610632294, 86-123032/19
- Chisso, Abstract of Japan Patent 080949 16 Apr 85, DE 3531612, 86-088826/14
- Fahma, F. 1997. Pengaruh Suhu dan Agitasi pada Produksi Asam Hialuronat oleh *Streptococcus zooepidemicus*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Hadioetomo, R.S. 1989. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. PT. Gramedia, Jakarta.
- Johns, M.R., L.T. Goh and A. Oeggerli. 1994. Effect of pH, Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnol. Lett.*, 16 (5), 507 – 512.
- Laurent, T.C. 1970. Structure of Hyaluronic Acid dalam Chemistry and Molecular Biology of Intercellular Matrix Vol. 2. E.A. Balasz (Ed). Academic Press, New York.
- Mackay, M.E. 1988. Rheology for Non Rheologist. Department of Chemical Engineering, The University of Queensland, Australia.
- Mangunwidjaja, D dan A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Noor, E. 1989. Hyaluric Acid Production By Streptococcus, Particularly *Streptococcus Zooepidemicus*. Master Qualifying Project Research. Department of Chemical Engineering, The University of Queensland, Australia.
- Shiseido, Abstracts of Japan Patent 105942 25 May 84, DES3517629, 85-304437/49
- Shiseido, Abstracts of Japan Patent 06117 25 Mar 85, J64219394, 86-296107/48
- Smith, E.J. 1981. Biotechnology. The Institute of Biology. Edward Arnold Ltd., London.
- Sutherland, I.W. 1990. Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stanbury, P.F. and Whitaker. 1984. Principle of Fermentation Technology. Pergamon Press Ltd., Oxford.
- Van de Rijn, I. 1983. *Streptococcal* Hyaluronic Acid : Proposed Mechanism of Degradation and Loss of Synthesis During Stationary Phase. *J. Bact.* 156 : 1059-1065.
- Wirahadikusumah, M. 1989. Biokimia : Protein, Enzim dan Asam Nukleat. ITB, Bandung.